

学校编码: 10384

学号: 21620120153766

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

博士学位论文

在坏死中 MLKL 复合体的组成以及形成过程

The composition and formation of MLKL complex in necroptosis

黄德力

指导教师姓名: 韩家淮教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 7 月

论文答辩时间: 2015 年 8 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2015 年 7 月-

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定结构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘要

MLKL 的多聚化对于 TNF 介导的 RIP3 依赖的细胞坏死非常关键,但是 MLKL 多聚化的分子机制还不清楚。我们研究发现, MLKL 形成的多聚体包含八个 MLKL 分子,由两个二硫键偶联的四聚体以头对头的形式组成。在四聚体中鼠源 MLKL 的第 169 位和 275 位的半胱氨酸形成分子间的二硫键,但是细胞坏死并不依赖于分子间的二硫键。自磷酸化的 RIP3 募集 MLKL 到坏死小体中,在坏死小体中 MLKL 被 RIP3 磷酸化,磷酸化的 MLKL 在坏死小体中形成多聚体。多聚体的 MLKL 在转移到细胞膜的过程中或者在转运到细胞膜后从坏死小体中释放,介导细胞坏死。我们之前报道 MLKL N 端结构域就能介导细胞坏死,因此,我们在 MLKL N 端  $\alpha$  螺旋中做突变筛选,找到两个突变体,它们不能抑制 MLKL 四聚体的形成,但是能够抑制 MLKL 八聚体的形成、MLKL 细胞膜的转移和 TNF 介导的细胞坏死,表明只有八聚体的 MLKL 才能转移到细胞膜。我们进一步研究发现, MLKL N 端的结构域的完整性对于 MLKL 转移到细胞膜不是必需的,却是 MLKL 功能所必需的,表明 MLKL 定位到细胞膜上并不能直接破坏细胞膜。本文证明 RIP3 激活 MLKL 导致 MLKL 多聚化最终介导坏死的详细机制,对于充分认识细胞坏死的分子机制有着重要的作用。

**关键词:** 受体相互作用蛋白 3; MLKL; 细胞坏死; 多聚化

## Abstract

The formation of mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) oligomers is essential for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF)-induced necroptosis, but the mechanism of MLKL oligomer formation is still largely unknown. Here we show that the MLKL oligomer actually is octamer comprising of two previously identified tetramers most likely in their head-to-head position. C169 and C275 in mouse MLKL form inter-molecule disulfide bounds in the tetramer but the disulfide bounds is not required for MLKL oligomer formation and necroptosis. MLKL formed oligomers after being phosphorylated by RIP3 in necrosome, and released in its octamer from necrosome before or during the translocation of MLKL to plasma membrane. We screened out two MLKL mutants – each containing two amino acid mutations in  $\alpha$ -helix four of MLKL – that can form tetramer but not octamer and found them cannot be translocated to plasma membrane, suggesting octamer-specific translocation of MLKL during necroptosis. In addition, the intact structure of MLKL N-terminal  $\alpha$ -helix is indispensable for TNF-induced necroptosis but dispensable for plasma membrane translocation. Our data demonstrated the detailed molecular mechanism of MLKL activation and oligomerization.

**Keywords:** RIP3; MLKL; necroptosis; oligomerization

# 目 录

摘要.....	I
Abstract .....	II
目 录.....	III
Table of Contents .....	V
第一章 前 言 .....	1
1.1 细胞程序性坏死 .....	1
1.1.1 细胞凋亡的研究状况.....	1
1.1.2 TNFR1 介导的细胞坏死 .....	5
1.1.2.1 RIP1 和 RIP3 在细胞坏死中的作用.....	8
1.1.2.2 细胞坏死的生理病理功能 .....	13
1.2 细胞坏死的分子机制 .....	15
1.2.1 能量代谢与细胞坏死.....	15
1.2.2 MLKL 介导的细胞坏死.....	16
1.3 立题背景 .....	18
第二章 材料与方法 .....	19
2.1 实验仪器和试剂 .....	19
2.1.1 实验试剂 .....	19
2.1.2 实验仪器 .....	20
2.2 克隆相关实验方法 .....	20
2.2.1 质粒载体 .....	20
2.2.1.1 pBOBI 载体 .....	20
2.2.1.2 pLV 载体 .....	21
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化 .....	21

2.2.2.1 感受态细胞的制备 .....	21
2.2.2.2 质粒转化感受态细胞 .....	22
<b>2.2.3 质粒 DNA 的提取 .....</b>	<b>22</b>
2.2.3.1 中量提取质粒 DNA (碱裂解法) .....	22
2.2.3.2 大量质粒 DNA 提取 (CsCl 密度梯度离心法) .....	23
<b>2.2.4 质粒限制性酶切检测 .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.5 PCR 反应体系 .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.6 DNA 的回收和纯化 .....</b>	<b>25</b>
2.3.6.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....	25
2.3.6.2 从琼脂糖凝胶中回收 DNA .....	26
<b>2.2.7 DNA 的回收和纯化 .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.8 质粒载体的构建 .....</b>	<b>27</b>
2.2.8.1 连接酶非依赖性的克隆方法 .....	27
2.2.8.2 MLKL 及 MLKL 各种突变和缺失体的构建 .....	28
<b>2.3 细胞相关实验和方法 .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1 细胞培养 .....</b>	<b>29</b>
2.3.1.1 细胞培养相关试剂配置 .....	29
2.3.1.2 细胞的培养和传代 .....	29
2.3.1.3 脂质体 2000 转染法 .....	30
2.3.1.4 磷酸钙转染法 .....	30
<b>2.3.2 稳转细胞株筛选 .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.3 慢病毒包装与感染 .....</b>	<b>32</b>
2.3.3.1 慢病毒的包装 .....	32
2.4.3.2 细胞的病毒感染 .....	32
<b>2.4 蛋白质相关实验和方法 .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 蛋白复合体的体外交联 .....	32
2.4.2 免疫印迹, .....	33
2.4.3 免疫共沉淀 .....	35
<b>2.5 荧光共聚焦显微镜相关 .....</b>	<b>36</b>
<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>38</b>

3.1 RIP3 激酶活性促进 MLKL 在细胞坏死过程中形成四聚体.....	38
3.1.1 在 RIP3 依赖的坏死中 MLKL 形成四聚体 .....	38
3.1.2 MLKL 四聚体的形成依赖于 RIP3 .....	39
3.1.3 MLKL 四聚体的形成依赖于 RIP3 的激酶活性 .....	40
3.1.4 MLKL 多聚体依赖于 MLKL 的磷酸 .....	41
3.2 MLKL 在坏死小体中形成多聚体并且从坏死小体中解离执行细胞坏死 ..	42
3.2.1 MLKL 在坏死小体中形成四聚体 .....	42
3.2.2 MLKL 多聚体从坏死小体中解离 .....	44
3.2.3 RIP3 和 MLKL 在坏死过程中的细胞定位会发生变化.....	47
3.2.4 MLKL 磷酸化缺陷突变体促进 MLKL 和 RIP3 之间的相互作用 .....	48
3.3 MLKL 在细胞坏死过程中形成八聚体并且从坏死小体中释放.....	50
3.3.1 MLKL 在细胞坏死过程中以四聚体为单位形成八聚体.....	50
3.3.2 MLKL 在坏死小体中形成八聚体 .....	52
3.3.3 在 TNF 介导的坏死过程中 MLKL 八聚体从坏死小体中解离 .....	53
3.4 TNF 介导的坏死依赖于 MLKL 多聚化不依赖于 MLKL 二硫桥.....	55
3.4.1 TNF 诱导的坏死不依赖于 MLKL 四聚体中的二硫桥.....	55
3.4.2 TNF 介导的细胞坏死依赖于 MLKL 的多聚化 .....	57
3.4.3 MLKL C169S 突变体和 C275 突变体在坏死中也能转移到细胞膜表面 .....	58
3.5 TNF 介导的细胞坏死依赖于 MLKL 八聚体化.....	59
3.5.1 人源的 MLKL 在能够自发形成八聚体.....	59
3.5.2 人源 MLKL 通过第 86 位半胱氨酸形成二硫键偶联的八聚体.....	61
3.5.3 TNF 介导的细胞坏死依赖于 MLKL 八聚化 .....	62
3.5.4 四聚体的 MLKL 不能转运到细胞膜表面.....	64
3.5.5 在 TNF 介导的细胞坏死中 MLKL 膜定位不足以导致细胞坏死 .....	65
3.6 讨论 .....	67
附录 1 图表索引 .....	70
附录 2 缩略语及中英文对照.....	72
参考文献 .....	77



致谢.....	86
---------	----

厦门大学博士论文摘要库

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>II</b>
<b>Table of contents in Chineses.....</b>	<b>III</b>
<b>Table of contents in English.....</b>	<b>V</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Programmed cell death .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Research in apoptosis .....	5
1.1.2 TNF-induced necroptosis .....	8
1.1.2.1 The function of RIP1 and RIP3 in necroptosis .....	13
1.1.2.2 The physiological function of necroptosis.....	15
<b>1.2 The molecular mechanism of necroptosis .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Energy metabolism and necroptosis.....	15
1.2.2 The function of MLKL in necroptosis .....	16
<b>1.3 Background of this thesis.....</b>	<b>18</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Experimental equipments and reagents .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Experimental reagents .....	19
2.1.2 Experimental equipments .....	20
<b>2.2 Clone-related protocols.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Vectors .....	20
2.2.1.1 The information of pBOBI vector.....	20
2.2.1.2 The information of pLV vector .....	21
2.2.2 Preparation of E.coli competent cells and DNA transformation .....	21
2.2.2.1 Preparation of E.coli competent cells .....	21

2.2.2.2	DNA transformation into E.coli competent cells .....	22
2.2.3	DNA purification.....	22
2.2.3.1	Midi-prep of plasmid DNA by alkaline lysis .....	22
2.2.3.2	Maxi-prep of plasmid DNA by CsCl gradient centrifugation.....	23
2.2.4	Digestion of plasmid DNA with restriction enzymes .....	25
2.2.5	PCR experiments.....	25
2.2.6	The purification and recovery and of DNA.....	25
2.2.6.1	Agarose gel electrophoresis .....	25
2.2.6.2	Recovery of DNA from agarose gel.....	26
2.2.7	DNA ligation reaction .....	26
2.2.8	Construction of plasmid vector.....	27
2.2.8.1	Ligase independent clone.....	27
2.2.8.2	Construction of MLKL WT and mutants vectors.....	28
<b>2.3</b>	<b>Cell-related experiments and protocols.....</b>	<b>29</b>
2.3.1	Cell culture .....	29
2.3.1.1	The reagents related to cell culture .....	29
2.3.1.2	Cell culture and passage.....	29
2.3.1.3	Lipo2000 transfection .....	30
2.3.1.4	Calcium phosphate transfection .....	30
2.3.2	Selection of stable cell line .....	31
2.3.3	Lenti-virus package and infection.....	32
<b>2.4</b>	<b>Protein-related experiments and protocols .....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Protein complex cross-link <i>in vitro</i> .....	32
2.4.2	Western blotting .....	33
2.4.3	Co-immunoprecipitation.....	35
<b>2.5</b>	<b>Confocal microscopy-related protocols .....</b>	<b>36</b>
<b>Chapter 3</b>	<b>Results and discussion.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>RIP3 kinase activity is required for the formation of MLKL tetramer ..</b>	<b>38</b>

3.1.1 MLKL forms tetramer on necroptosis induction .....	38
3.1.2 RIP3 is required for the formation of MLKL tetramer .....	39
3.1.3 RIP3 kinase activity is required for the formation of MLKL tetramer ...	40
3.1.4 The formation of MLKL tetramer is dependent on the phosphorylation of MLKL .....	41
<b>3.2 MLKL forms oligomers in necrosome and release from necrosome after oligomer formation .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 MLKL forms oligomers in necrosome .....	42
3.2.2 MLKL oligomers release from necrosome .....	44
3.2.3 Location of RIP3 and MLKL were changed on necroptosis induction...	47
3.2.4 MLKL phosphorylation mutants promote the intensity of the interaction between RIP3 and MLKL .....	48
<b>3.3 MLKL forms octamer in necrosome and release from necrosome ....</b>	<b>50</b>
3.3.1 MLKL octamer contains two disulfide bound-linked MLKL tetramers ....	50
3.3.2 MLKL forms octamer in necrosome .....	52
3.3.3 MLKL release from necrosome as octamer state.....	53
<b>3.4 Disulfide bound in MLKL oligomers is dispensable for MLKL oligomerization but the formation of octamer is required for MLKL to function in necroptosis.....</b>	<b>55</b>
3.4.1 Disulfide bonds in MLKL tetramer are dispensable for TNF-induced necroptosis.....	55
3.4.2 MLKL oligomerization is required for TNF-induced necroptosis.....	57
3.4.3 Disulfide bonds in MLKL complex are dispensable for MLKL membrane translocation .....	58
3.4.4 ICP6 overexpression induces wild-type L929 cell death in a RHIM dependent manner.....	59
<b>3.5 MLKL octamer is required for necroptosis induction.....</b>	<b>59</b>
3.5.1 Human MLKL can forms octamer in oxidation condition .....	59

3.5.2 Human MLKL forms disulfide bond linked octamer through cysteine	86
.....	61
3.5.3 MLKL octamer is necessary for TNF induced necroptosis .....	62
3.5.4 MLKL tetramer cannot translocate to plasma membrane .....	64
3.5.5 MLKL membrane translocation is not enough to mediate necroptosis...	65
<b>3.6 Discussion .....</b>	<b>67</b>
<b>Appendix 1 Index of figures and tables.....</b>	<b>70</b>
<b>Appendix 2 Abbreviations .....</b>	<b>72</b>
<b>Reference .....</b>	<b>77</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>86</b>

## 第一章 前言

### 1.1 细胞程序性坏死

在细胞死亡的研究历史上,根据形态学的不同,细胞死亡被研究人员分成两类,细胞凋亡(Apoptosis)和细胞坏死(Necrosis)<sup>[1]</sup>。

细胞凋亡是一种程序性的死亡方式,受到细胞内在基因的调控,发生在正常发育、衰老、病理以及机体细胞稳态平衡的过程中。在形态学上细胞凋亡有如下特征:细胞质皱缩、变圆、细胞体积变小、染色质固缩、核膜变得非连续性,DNA被切割成核小体大小,细胞内容物被细胞膜包裹成大小不等的囊泡,以凋亡小体的形式释放出去,被周围的细胞吞噬<sup>[2, 3]</sup>。由于细胞凋亡既没有细胞内容物的释放,又不会产生炎症因子,因此被称为安全的死亡方式。经过几十年的研究细胞凋亡的分子机制也逐渐清楚,是目前研究的最清楚的死亡方式。

细胞坏死被认为是一种不受调控的死亡方式,是一类由机械力损伤、高温、低温和有毒物质等等引起的被动死亡。由于发生细胞坏死时,细胞器肿胀崩裂,细胞膜破裂,细胞内容物释放到周围环境中,引起炎症反应,因此被认为是一种有害的死亡方式。但是越来越多的研究表明,坏死中也存在着一种同凋亡一样受到精确调控的死亡途径,被称为程序性坏死(Necroptosis)。程序性细胞坏死在发育和病理生理过程中发挥这重要的作用,已经成为细胞死亡领域研究的热点。

#### 1.1.1 细胞凋亡的研究状况

细胞凋亡(Apoptosis)最早是由 Kerr, Wyllie 和 Currie 在描述一种形态学上与其他死亡方式不同的死亡形式,之后被大家广为接受<sup>[4-6]</sup>。我们最初对细胞凋亡分子机制的了解是建立在对秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)发育的基础之上。线虫在发育过程中会产生 1090 个体细胞,其中 131 个体细胞会在发育的过程中走向凋亡或者程序性细胞死亡(Programmed cell death)。这 131 个细胞在不同的线虫中,都是在发育的同一时期走向凋亡,实验观察现象表明凋亡是

受到精确调控的<sup>[7]</sup>。Horvitz 和他的同事研究发现在线虫发育过程中凋亡的 131 个细胞受到少量基因的调控，他们把这些基因命名为细胞凋亡缺陷 (Cell death defective, Ced)，之后的研究克隆出了其中的一个基因 Ced3,发现是一个限制性蛋白酶，天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (Cysteiny protease cleaving at the carboxyl side of an aspartic acid, Caspase)，这是第一次发现一个基因能够执行凋亡，并且这个基因从线虫到哺乳动物进化的过程中都是保守的<sup>[8]</sup>。在这之后大量的底物以及 Ced-3 的同源基因被发现，细胞凋亡也成为最近二十几年研究最热门的领域之一。

到目前，研究表明存在两条主要凋亡途径：外源死亡受体通路和内源线粒体通路，同时两条通路也能够相互影响<sup>[9]</sup>。另外还有一条凋亡途径是 T 细胞介导的粒酶 A 或者粒酶 B 依赖的死亡方式。外源、内源和粒酶依赖的凋亡途径最终都是需要剪切激活 Caspase3。Caspase3 作为细胞凋亡的执行者，激活细胞质的核酸内切酶，活化的核酸内切酶剪切细胞基因组；同时激活细胞内的蛋白酶，活化的蛋白酶降解细胞核、剪切细胞骨架蛋白；活化的 Caspase-3 也会剪切细胞内的各种维持正常生理功能的蛋白，如细胞骨架、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(Poly ADP ribose polymerase,PARP)、细胞骨架蛋白阿尔法胞影蛋白 (Alpha-fodrin) 和核蛋白核有丝分裂器蛋白(Nuclear mitotic apparatus protein,NuMA)等等，最终导致形成了细胞凋亡特异性的形态学特征<sup>[10]</sup>。

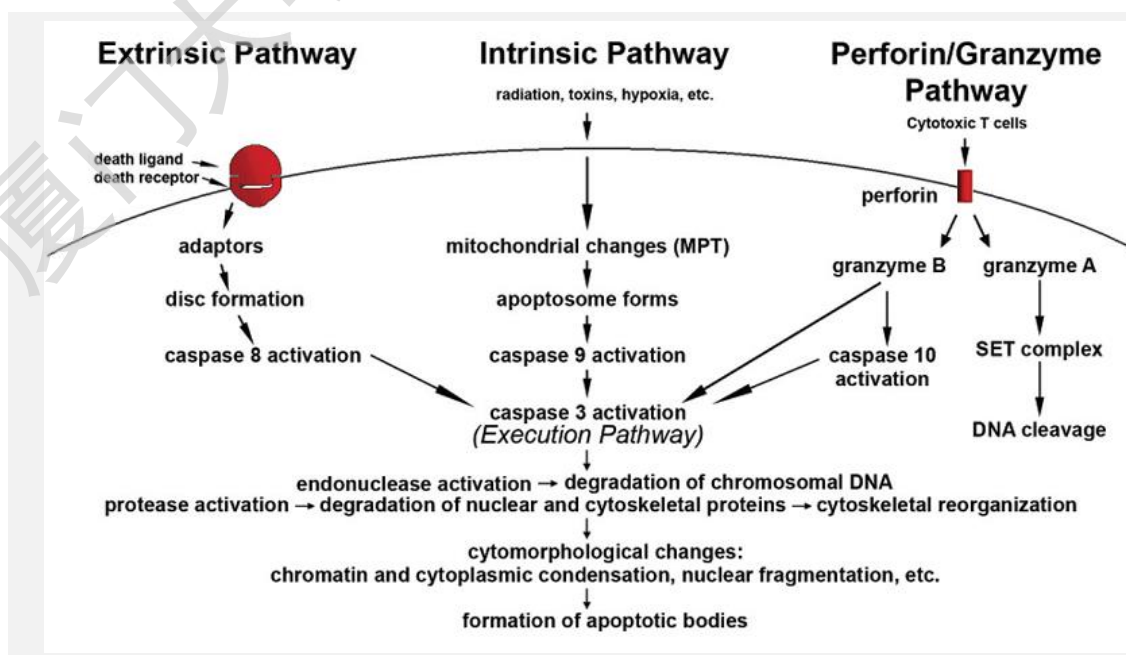


图 1.1 凋亡示意图

Fig 1.1 Schematic representation of apoptotic events<sup>[11]</sup>

研究比较清楚的外源性凋亡途径是通过跨膜受体相互作用导致起始细胞凋亡，这些导致细胞凋亡的死亡受体（Death receptor）都属于肿瘤坏死因子受体（Tumor necrosis factor receptor, TNFR）超家族<sup>[12]</sup>。TNFR 超家族成员都含有一个富含半胱氨酸的胞外结构域和一个大约 80 个氨基酸组成的胞内死亡结构域（Death domain）<sup>[13]</sup>，死亡结构域在把死亡信号从胞外传输到胞内的过程中发挥这至关重要的作用。目前报道研究比较清楚的死亡结构域的受体包括 FasR、TNFR1、DR3（Death receptor）、DR4 和 DR5<sup>[14-17]</sup>。我们下面以 TNFR1 来介绍死亡受体介导的细胞凋亡分子机制。TNF $\alpha$  和相应的受体 TNFR1 结合导致 TNFR1 三聚化，三聚化的 TNFR1 通过死亡结构域募集第一个衔接蛋白 TRADD（TNF-R1-associated death domain protein），TRADD 能够通过死亡结构域募集 FADD 和 RIP1<sup>[18, 19]</sup>。然后，FADD 能够通过死亡效应结构域（Death effector domain）和 Caspase8 相互作用，形成死亡诱导复合体（Death-inducing signaling complex, DISC），导致 Caspase8 自剪切活化<sup>[20]</sup>。一旦 Caspase8 被活化，细胞凋亡就会开始执行。胞内 FLICE 抑制蛋白（cellular FLICE-inhibitory protein, cFLIP）能够通过和 FADD 和 Caspase8 相互作用而抑制死亡受体介导的细胞凋亡<sup>[21, 22]</sup>。

内源性凋亡途径是通过各种不同的非受体刺激介导的，如射线、毒素、低氧、病毒感染、和氧自由基等等。这些刺激物的共同点作用结果是，打开线粒体通透转换（Mitochondrial permeability transition, MPT）孔，导致线粒体膜电势的丢失，最终释放促凋亡蛋白细胞色素 c（Cytochrome c）、Smac/DIABLO 和丝氨酸蛋白 HtrA2/Omi<sup>[23-26]</sup>。这些蛋白能够激活 Caspase 依赖的线粒体途径。细胞色素 c 与凋亡酶激活因子-1（apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1）和 caspase9 结合形成线粒体凋亡复合体，激活 caspase9<sup>[27, 28]</sup>。Smac/DIABLO 和 HtrA2/Omi 通过抑制 IAP(Inhibitors of apoptosis proteins)的活性促进细胞凋亡<sup>[29, 30]</sup>。Bcl-2（B-cell lymphoma 2）家族的蛋白精确的调控着细胞线粒体内源途径的凋亡<sup>[31]</sup>。肿瘤抑制基因 P53 通过对 Bcl-2 家族蛋白的表达调控，在细胞内源凋亡途径中有着非常重要的作用<sup>[32]</sup>。Bcl-2 家族的蛋白通过调控线粒体膜的通透性来调控内源



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.